



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS $\alpha(1,6)$ FUCOSILADAS IMPLICADAS EN LA MALIGNIZACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Sara Fernández Mojón
24/07/2014

**ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS $\alpha(1,6)$ FUCOSILADAS
IMPLICADAS EN LA MALIGNIZACIÓN DEL CÁNCER
COLORRECTAL**

**ESTUDO DA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS $\alpha(1,6)$ FUCOSILADAS
IMPLICADAS NA MALIGNIZACIÓN DO CANCRO
COLORRECTAL**

**STUDY OF EXPRESSION OF $\alpha(1,6)$ FUCOSYLATED PROTEINS
INVOLVED IN COLORECTAL CANCER MALIGNANCY**

AUTORA: SARA FERNÁNDEZ MOJÓN

DIRECTORES:

- Dra. ALMUDENA FERNÁNDEZ BRIERA y Dr. EMILIO GIL MARTÍN, respectivamente Catedrática y Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología (C03) de la Universidad de Vigo.

CODIRECTORA:

- Dra. M^a ESPERANZA CERDÁN VILLANUEVA, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña.

FECHA DE PRESENTACIÓN: 24 de Julio del 2014



ÍNDICE



1. INTRODUCCIÓN	
1.1. CÁNCER COLORRECTAL	6
1.2. TRANSICIÓN EPIELO-MESÉNQUIMA (EMT).....	11
1.3. MOLÉCULAS CON IMPLICACIÓN EN EMT.....	12
1.4. α (1,6)FUCOSILACIÓN DE PROTEÍNAS	15
1.5. PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EMT DE CCR...17	
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO	24
3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRA PROTEICA.....	25
3.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA.....	26
3.4 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	27
3.5 WESTERN-BLOT.....	27
3.6 INMUNOBLOT.....	28
3.7 BORRADO Y REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE <i>BLOTTING</i> (<i>STRIPPING</i>).....	30
3.8 SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>FUT8</i> EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER DE COLON SW 480 Y SW 620.....	30
	Y
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA.....	33
4.2 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN LÍNEAS CELULARES DE CCR.....	33
4.3 CONFIRMACIÓN DEL SILENCIAMIENTO DE <i>FUT8</i> EN SW 480 Y SW 620.....	41
4.4 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN LÍNEAS SW 480 Y SW 620 SILENCIADAS EN <i>FUT8</i>	43
5. CONCLUSIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA	49
7. ABREVIATURAS	57



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un importante problema de salud pública en el mundo occidental. Representa la segunda causa de muerte por cáncer en Europa, donde, en números absolutos, es el tumor maligno más frecuente, con 300.000 nuevos casos al año. En España, por su parte, el CCR es la segunda causa de mortalidad por cáncer, con más de 11.000 fallecidos por año. En incidencia, sin embargo, con más de 25.000 nuevos casos detectados al año en Europa, es la neoplasia más frecuente en cifras globales no desagregadas por sexo, si bien ocupa el segundo lugar después del cáncer de pulmón en el hombre (Figura 1) y la misma posición tras el cáncer de mama en la mujer (Figura2) (Ferlay *et al.*, 2010).

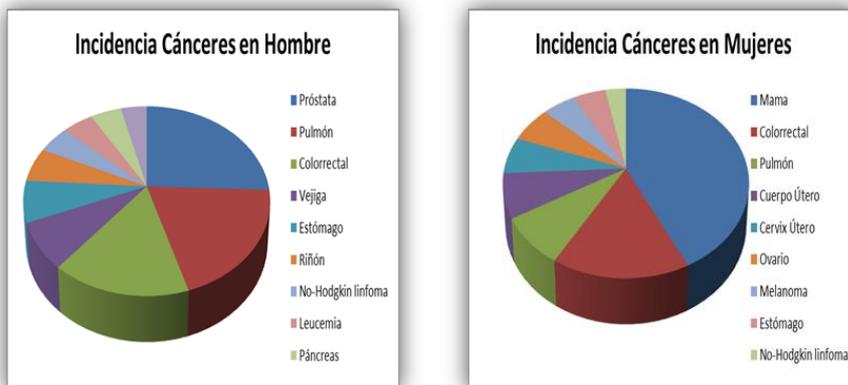


Figura 1. Cánceres más frecuentes en hombres en Europa 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).

Figura 2. Cánceres más frecuentes en mujeres en Europa 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).

La supervivencia de los pacientes con CCR, por su parte, depende de muchos factores, entre los cuales destaca por su mayor importancia el estadio tumoral, lo que convierte en crucial la correcta clasificación de los tumores. Para este cometido la clasificación internacional de referencia es la TNM (Figura 3), desarrollada y mantenida por las asociaciones *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y *Union for International Cancer Control (UICC)*.

El sistema de estadificación TNM define tres variables clave de información histopatológica, la extensión del tumor (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M), distinguiendo las siguientes categorías dentro de cada variable:

T: nivel de extensión del tumor primario en las paredes del intestino.

- T0: sin evidencia de tumor primario.
- Tx: no se puede evaluar el tumor primario.
- Tis: tumor *in situ*, confinado a la mucosa, que no traspasa las capas de la misma.
- T1-T4: tamaño y extensión del tumor primario.

N: presencia de afectación o no de los ganglios linfáticos regionales o más próximos a la zona donde se localiza el tumor.

- Nx: los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
- N0: ausencia de afectación ganglionar.
- N1-N3: afectación ganglionar.

M: presencia de metástasis.

- M0: ausencia de metástasis.
- M1: presencia de metástasis a distancia.

La combinación de los tres parámetros da lugar a la siguiente clasificación:

Estadio 0 o carcinoma *in situ*: es la fase más temprana del cáncer de colon o recto. Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa y en ningún caso la traspasan. No existe afectación de los ganglios linfáticos locoregionales.

Estadio I: el tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.

Estadio II: el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede existir invasión de los órganos anexos. No se aprecia afectación ganglionar.

Estadio III: el cáncer ha invadido los órganos más próximos, así como los ganglios linfáticos locorregionales.

Estadio IV: el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del foco tumoral primario, como hígado, pulmón o hueso.

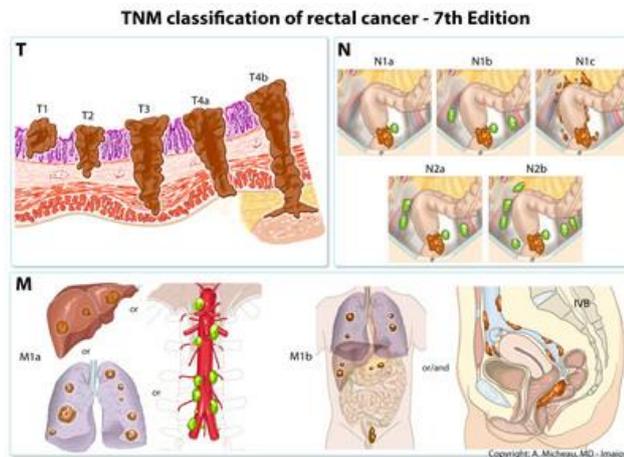


Figura 3. Estadificación TNM en cáncer colorrectal (AJCC, 2009).

Una clasificación anterior a la TNM, muy utilizada todavía en algunos estudios por su simplicidad y potencia descriptiva de la patogenicidad del tumor, es la propuesta por Dukes (Dukes, 1932). Este sistema de estadificación reconoce los siguientes estadios patológicos:

- **Estadio A:** lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.
- **Estadio B1:** el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.
- **Estadio B2:** afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.
- **Estadio C:** la enfermedad se presenta en parte o toda la pared, con afectación ganglionar.

- **Estadio D:** existe afectación de órganos alejados.

Por lo que se refiere al origen de esta neoplasia, la etiología del CCR es muy compleja. Están implicados en ella tanto factores ambientales como genéticos, y es la combinación de ambos la que provoca la transformación de una mucosa intestinal sana en un tumor colorrectal. En este sentido, los estudios epidemiológicos efectuados en cohortes amplias de pacientes con diverso origen étnico, además de los estudios clásicos realizados en poblaciones de emigrantes (en los que la población migrante adquiere en poco tiempo las tasas de incidencia de la población local), sugieren que los factores ambientales juegan un papel muy importante en la etiología del CCR, considerándose responsables de hasta un 70-80% de la incidencia de la enfermedad. Este hecho identifica claramente el cáncer colorrectal como la mayor neoplasia cuyas causas pueden ser rápidamente identificadas y, en consecuencia, evitada una gran parte de la enfermedad (Boyle & Langman, 2000). Entre el conjunto de factores de riesgo con implicación en la etiología y patogénesis del CCR, encontramos (Tabernero, 2007; Abad, 2009):

- ✓ edad avanzada
- ✓ varón
- ✓ colecistectomía
- ✓ factores hormonales (nuliparidad, menopausia precoz, edad avanzada en primer embarazo...)
- ✓ factores ambientales (tabaco, alcohol, obesidad, sedentarismo...)
- ✓ historial de pólipos colorrectales
- ✓ factores genéticos:
 - poliposis adenomatosa familiar (PAF) y sus variantes fenotípicas
 - cáncer de colon y recto hereditario sin poliposis (CCHNP)
 - síndrome de poliposis hamartomatosa (síndrome de Peutz-Jeghers, poliposis juvenil, síndrome de Cowden)

En la etiología genética del cáncer colorrectal se han vinculado varios genes, que pueden englobarse en 4 categorías:

1. protooncogenes: *K-ras*, *src* y *c-myc*.
2. genes de supresión tumoral: *APC* (poliposis adenomatosa del colon), *DCC* (supresor del cáncer del colon), *p53*, *MCC* (mutado en el cáncer del colon) y *DPC4*.
3. genes de mal emparejamiento: *hMSH2*.
4. genes modificadores del riesgo: fosfolipasa A, *COX2* (ciclooxigenasa 2) y *CD44v*.

El CCR constituye el mejor ejemplo de la existencia de una pauta mutacional progresiva (Figura 4), esto es, una secuencia de eventos de mutación que conducen desde la mucosa normal a una lesión benigna (pólipo), y de ésta a un carcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein *et al.*, 2013).

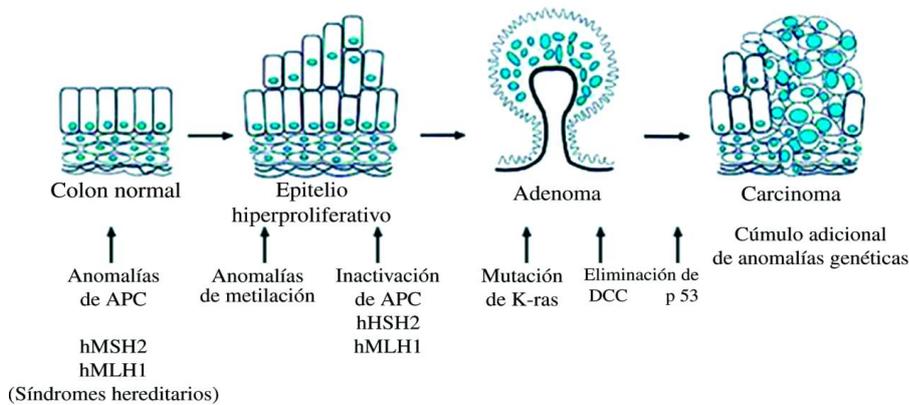


Figura 4. Secuencia de las alteraciones genéticas etiopatogénicas en el cáncer de colon (García & Pardo, 2007).

1.2. TRANSICIÓN EPITELIO -MESÉNQUIMA (EMT)

Las células epiteliales y las células mesenquimales (o mesenquimatosas) representan dos de los principales tipos celulares en mamíferos.

Las células epiteliales se caracterizan por: (1) gran cohesión celular; (2) existencia de tres dominios o regiones funcionalmente especializadas en la membrana (polos apical, basal y lateral); (3) existencia de uniones estrechas entre los dominios apicales y laterales; (4) distribución polarizada apico-basal de los orgánulos y de los componentes del citoesqueleto; y (5) pérdida de la movilidad individual. Por el contrario, las células mesenquimales destacan por: (1) pérdida de cohesión celular; (2) ausencia de diferenciación clara entre la membrana apical y la basal; (3) ausencia de distribución polarizada apico-basal de orgánulos y componentes del citoesqueleto; (4) gran movilidad y capacidad de invasión.

Durante el proceso normal de desarrollo o maduración de órganos y tejidos, ciertas células pueden perder su fenotipo epitelial y adquirir un fenotipo mesenquimal, proceso conocido como Transición Epitelio-Mesenquima (EMT). Así, muchos eventos del desarrollo, incluida la gastrulación, la formación de la cresta neural o la morfogénesis del corazón, tienen su base en la transición epitelio-mesenquima de algunas líneas celulares. En años recientes los avances en oncología molecular han puesto de manifiesto que un proceso similar a la EMT ocurre durante la progresión de los tumores epiteliales, de manera que las células epiteliales perfectamente diferenciadas de las mucosas adquieren un estado mesenquimatoso, que les confiere mayor movilidad y un aumento de su potencial de invasividad (Boyer *et al.*, 2000). Desde el alumbramiento de esta importante observación, se ha abierto un nuevo campo a la investigación oncológica, interesado por la completa descripción molecular de las proteínas responsables de la EMT, de sus factores de regulación normal durante el desarrollo y de las variables y mecanismos que promueven la desdiferenciación de las células epiteliales durante el desarrollo del cáncer (Guarino, 2007). Observaciones recientes, sin embargo, cuestionan el proceso de EMT y en su lugar sugieren la hipótesis de que la transición de las células cancerosas puede ser epitelio-mieloide, debido a los múltiples marcadores específicos de linajes mieloides que poseen (Schramm, 2014).

1.3. MOLÉCULAS CON IMPLICACIÓN EN LA EMT

Se conocen múltiples proteínas con implicación en la EMT, pero en este proyecto prestaremos especial atención a las siguientes:

E-cadherina y N-cadherina

Una característica molecular muy importante de la EMT es la disrupción de los contactos célula-célula normales, lo que se logra con la reducción de los niveles de la E-cadherina. Esta molécula de adhesión celular es una glicoproteína transmembrana, calcio-dependiente, localizada en la mayoría de las células epiteliales embrionarias y de los tejidos adultos. La E-cadherina es una pieza clave en la transformación neoplásica, ya que actúa como un supresor de tumor, que inhibe la invasión y la metástasis, y que con mucha frecuencia experimenta menor expresión o degradación durante la transformación (Vleminckx *et al.*, 1991). Además, recientemente se ha observado que la función de la E-cadherina durante la progresión del tumor es frecuentemente reemplazada o incluso sobreemplazada por la expresión de cadherinas mesenquimales, como la N-cadherina o la cadherina 11 (revisado por Cavallaro *et al.*, 2002). Así pues, mientras las cadherinas epiteliales (E-cadherina como prototipo de la familia) tienen un papel crítico en la formación y en el mantenimiento de la estructura de los epitelios, regulando la adhesión célula-célula (Nieman *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2000), las cadherinas mesenquimales, como la N-cadherina, se expresan preferentemente en células migratorias y en células de tejidos conectivos, promoviendo la movilidad celular y la migración (Islam *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001).

β -catenina

No solo las cadherinas están implicadas en la tumorigénesis y en la metástasis, ya que la función de sus compañeras citoplasmáticas, las cateninas, resulta también importante en la aparición y progresión del cáncer (Brabeltz *et al.*, 2001; Brabeltz *et al.*, 2002). De hecho, los dominios intracelulares de las cadherinas clásicas interaccionan con β -catenina, γ -catenina y p120 para agregarse en el complejo citoplasmático de adhesión celular (CCC), que tiene un papel crítico en la adhesión célula-célula. La β -catenina y γ -

catenina se ensamblan directamente a la α -catenina, la cual une el CCC a la actina del citoesqueleto. Aunque la β -catenina se localiza en las membranas celulares de las células epiteliales normales y de las células tumorales no invasivas, se encuentra también en el citoplasma (reflejando la disociación de la E-cadherina) y en el núcleo (reflejando su importante papel como activador transcripcional) de células en proceso de EMT (Brabletz *et al.*, 1998). Por este motivo, se considera que la sobreexpresión nuclear de la β -catenina está involucrada en la EMT.

α -actina

La actina es la proteína más abundante del citoesqueleto de las células y la proteína más abundante en la mayoría de los tipos celulares. En vertebrados presenta 6 isoformas, cada una codificada por un gen diferente, aunque todavía no se conocen sus implicaciones biológicas (Yao *et al.*, 1995). Las diferentes isoformas son específicas de tejido; las células de tejido muscular liso presentan las isoformas α y γ , mientras que las células no musculares presentan las isoformas β y γ (Fagotti *et al.*, 1998). Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma durante el ciclo celular. También participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y controla las interacciones celulares, la adhesión molecular y el transporte intracelular (Guirado *et al.*, 2002). Existen evidencias, asimismo, del aumento de esta proteína en el proceso de carcinogénesis, el cual podría estar justificado por la participación de los filamentos de actina en procesos biológicos como la división celular, las interacciones celulares, la adhesión y migración celular (Evers *et al.*, 2000).

Vimentina

La vimentina es la proteína de la familia de los filamentos intermedios más extendida (Ivaska *et al.*, 2007). Localizada en el citoplasma de las células mesenquimales, su función es el mantenimiento de la cito-arquitectura celular e integridad tisular (Satelli *et al.*, 2011). Esta proteína ha cobrado últimamente mucha importancia como marcador de la EMT. De hecho, uno de los distintivos de este proceso es la sobreexpresión de la vimentina. Aunque ésta no parece ser esencial para el crecimiento, división celular o desarrollo, sin embargo contribuye al potencial metastásico de muchos cánceres

(Hendrix *et al.*, 1997). En este sentido, las células en el centro del CCR mantienen un fenotipo epitelial, mientras que las células del frente invasivo exhiben un fenotipo mesenquimal caracterizado por la pérdida de adhesión celular y el incremento de la expresión de vimentina (Barker *et al.*, 2001).

c-kit (CD117)

c-kit o CD117 es un receptor transmembrana de tipo tirosín-quinasa que opera en la transducción de la señal en varios tipos celulares. Dicho receptor lidera una cascada de fosforilación, que desencadena la activación de diferentes factores de transcripción y con ello regula la apoptosis, la diferenciación celular, la proliferación y adhesión celular (Miettinen & Lasota, 2005). Se ha observado que la sobreexpresión de *c-kit* interviene en la represión del fenotipo epitelial, así como en la inducción del fenotipo mesenquimal, erigiéndose, por tanto, en otro mediador necesario de la EMT (Tang *et al.*, 2014).

Molécula de adhesión de las células neurales (NCAM o CD56)

La molécula de adhesión de las células neurales (NCAM o CD56) es una conocida proteína de adhesión celular, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. Los contactos intercelulares mediados por la NCAM pertenecen a la más común de las adhesiones intercelulares independientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en los vertebrados y, como ocurre con las cadherinas, parece que puede unir las células entre sí mediante una interacción homofílica (entre moléculas NCAM de células adyacentes), aunque también puede estar implicada en interacciones heterofílicas (Burg *et al.*, 1995; Cavallaro *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2004). Asimismo, NCAM tiene un papel como receptor de transducción de señales, estimulando en este caso al receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFRs) mediante la inducción de cascadas de señalización que promueven la movilidad celular y la invasión (Cavallaro *et al.*, 2001; Walsh & Doherty, 1997). En este mismo sentido, se ha revelado que el gen de la NCAM es una diana para el establecimiento del complejo de señalización β -catenina-LEF/TCF (Connaci-Sorrellet *et al.*, 2002), relacionando estrechamente la glicoproteína NCAM con la activación de la ruta de señalización Wnt encontrada en CCR (Logan & Nusse, 2004).

1.4. $\alpha(1,6)$ FUCOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

La fucosilación es uno de los procesos integrantes de la modificación postraduccional por glicosilación de las proteínas. Consiste en la transferencia de un residuo de fucosa – desde el sustrato dador activado GDP-fucosa– sobre las antenas glucídicas de los glicoconjugados aceptores, tanto glicoproteínas como glicolípidos. Estas estructuras fucosiladas tienen un papel muy importante en diversos procesos biológicos y patológicos que ocurren en las células eucariotas (desarrollo tisular, angiogénesis, adhesión celular, inflamación, diseminación tumoral...) y en organismos procariotas (mimetismo, adhesión y colonización de hospedadores) (Miyoshi *et al.*, 2008).

Las reacciones de transferencia de unidades de fucosa son catalizadas por la familia de enzimas fucosiltransferasas (FUT). Siguiendo el criterio de la IUBMB (International Union of Biochemistry & Molecular Biology), las FUT se enmarcan dentro de la superfamilia de glicosiltransferasas (EC 2.4.1.x.y), que el CAZY (*Carbohydrate-Active enZYmes data base*) define como el grupo de enzimas que catalizan la incorporación de una fucosa, procedente del complejo nucleotídico GDP-fucosa, sobre un oligosacárido, glicolípido o glicoproteína (Oriol *et al.*, 1999).

Según la posición en la que se incorpore el residuo de fucosa, distinguimos:

- $\alpha(1,2)$ fucosilación, en la que se añaden residuos de fucosa mediante enlace $\alpha(1,2)$ a la galactosa terminal de un resto de lactosamina (Larsen *et al.*, 1990). Esta reacción la catalizan la FUT1 y la FUT2. Este tipo de fucosilación también es propio de las O-fucosiltransferasas de proteínas 1 (POFUT1) y 2 (POFUT2), que añaden directamente unidades de fucosa a los residuos de Ser o Thr de las O-glicoproteínas (Wang *et al.*, 2001).
- $\alpha(1,3)$ fucosilación, en la que se añaden unidades de fucosa mediante enlace $\alpha(1,3)$ a la GlcNAc de una lactosamina tipo I. Esta reacción es catalizada por las enzimas FUT3 (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990), FUT4 (Goelz *et al.*, 1990), FUT5 (Weston *et al.*, 1992 a), FUT6 (Weston *et al.*, 1992 b), FUT7 (Natsuka *et al.*, 1994) y FUT9 (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000).
- $\alpha(1,4)$ fucosilación, en la que se añaden unidades de fucosa mediante enlace $\alpha(1,4)$. Esta reacción es característica de las FUT3 y FUT5 (Kukowska-Latallo

et al., 1990), que son las únicas glicosiltransferasas capaces de catalizar la formación de más de un tipo de enlace, $\alpha(1,3)$ o $\alpha(1,4)$.

- $\alpha(1,6)$ fucosilación, también denominada fucosilación del *core* porque la transferencia del residuo de fucosa mediante un enlace $\alpha(1,6)$ se realiza sobre el resto de GlcNAc más interno del núcleo oligosacárido del N-glicano. La única enzima capaz de catalizar esta transferencia es la enzima $\alpha(1,6)$ fucosiltransferasa [$\alpha(1,6)$ FT], codificada por el gen *FUT8* (Miyoshi *et al.*, 1997).

$\alpha(1,6)$ fucosiltransferasa [$\alpha(1,6)$ FT, , EC 2.4.1.68]

En este proyecto se presta especial atención a la actuación y relevancia de la enzima $\alpha(1,6)$ FT por tratarse de una enzima singular, la única fucosiltransferasa facultada para la introducción de fucosa mediante enlace $\alpha(1,6)$ al residuo de N-acetilglucosamina más interno de la fracción de quitobiosa del núcleo o *core* de las N-glicoproteínas. Esta modalidad de fucosilación (*core*-fucosilación), además, modula el curso posterior de la glicosilación de las N-glicoproteínas y por ello se considera crítica para su correcta estructuración y plena funcionalidad (Stubbs *et al.*, 1996). Nuestro interés en esta enzima radica en su presumible implicación en la regulación de la adhesión célula-célula y en la EMT de las células tumorales, merced a que algunas importantes proteínas vinculadas a dichos procesos presentan $\alpha(1,6)$ fucosilación.

La $\alpha(1,6)$ fucosilación es crucial para la actividad de proteínas de reconocimiento y adhesión celular implicadas en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), el cual en buena medida determina la invasión tumoral (Kang & Massague, 2004) al promover la pérdida de polaridad y red de contactos de las células epiteliales, la profunda remodelación de su citoesqueleto y la adquisición de un fenotipo migratorio acompañado de un programa de expresión génica de tipo mesenquimal.

La enzima $\alpha(1,6)$ FT, al igual que el resto de glicosiltransferasas es una proteína transmembrana de tipo II, localizada fundamentalmente en las membranas de las cisternas *trans* del aparato de Golgi. En esta ubicación realiza su función, consistente, como se ha comentado anteriormente, en participar activamente en la *core*-fucosilación de los glicoconjugados. Es importante recordar, asimismo, que la introducción de fucosa sobre el *core* glucídico de las N-glicoproteínas modifica la disposición espacial de éste e influye mecánicamente en el curso ulterior de la glicosilación, por lo que tiene efectos importantes en la estructura y funcionalidad de la glicoproteína madura. En

este sentido, por ejemplo, es conocida la modulación ejercida por la $\alpha(1,6)$ fucosilación en las interacciones carbohidrato-proteína necesarias para una adecuada relación de la célula con el medio circundante (Stubbs *et al.*, 1996), de manera que la fucosilación del *core* repercute sobre el comportamiento de adhesión normal de la célula, lo que a su vez sugiere su posible relevancia en la regulación de la adhesividad de las células tumorales. En este sentido, el estatus funcional de la $\alpha(1,6)$ FT adquiere importancia en el comportamiento de las células tumorales, como lo demuestran algunos de los trabajos realizados por nuestro grupo que han demostrado la elevación de la actividad y expresión de esta enzima en correlación con el grado de malignidad (Muínelo-Romay *et al.*, 2008), así como el valor pronóstico independiente de su expresión para predecir la recurrencia local del tumor (con un aumento de 3.6 veces del riesgo de recidiva) (Muínelo-Romay *et al.*, 2011).

1.5. PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA EMT DEL EPITELIO COLORRECTAL

La carcinogénesis resulta de una secuencia de alteraciones moleculares que llevan al desarrollo de un tumor. Su entendimiento es clave para el diseño de estrategias de prevención, diagnóstico temprano y tratamiento del cáncer. Se han descrito varias vías con una importante implicación en la EMT (Figura 5). A continuación, describiremos las más importantes de ellas.

1.3.1. Vía Smads

Es la vía mediada por la unión como ligando de TGF- β a los receptores transmembrana serina/treonina quinasa de tipos I y II. La unión del TGF- β al receptor de tipo II induce la fosforilación y activación del receptor de tipo I, el cual cataliza entonces la fosforilación de Smad2/Smad3 (Wakefield *et al.*, 2002). Una vez fosforiladas, Smad2/Smad3 forman un complejo heterodimérico con el supresor tumoral Smad4, haciendo posible la translocación de éste al núcleo y su actuación como regulador transcripcional (Dijke & Hill, 2004).

1.3.2. Vía del Akt/PKB

La serina/treonina quinasa oncogénica Akt (también conocida como PKB) es un efector corriente abajo (*downstream*) de la PI3K, que está implicado en la represión de la transcripción de la E-cadherina. Esta represión transcripcional desencadena la conversión de las células epiteliales en células mesenquimales (Grille *et al.*, 2003).

Varios autores han descrito la implicación directa de Akt en la morfología celular, tumorigenicidad, movilidad e invasividad de las células tumorales (Bellacosa *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2000; Brognard *et al.*, 2001). Además, son numerosos los estudios que involucran esta vía en la progresión y metástasis en CCR (Agarwal *et al.*, 2005; Rychachou *et al.*, 2006).

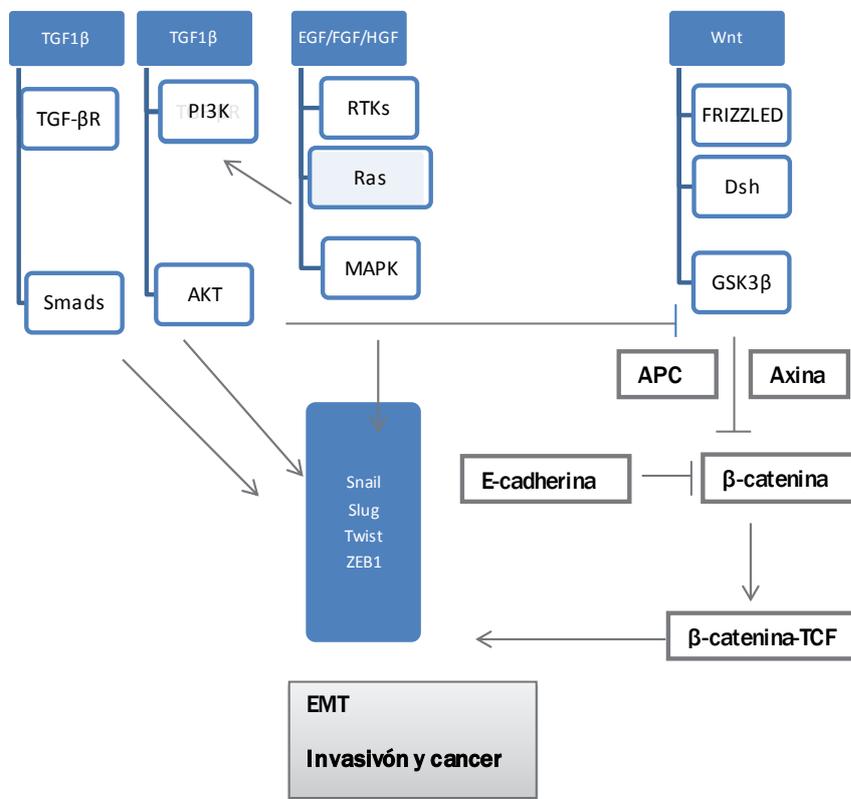


Figura 5. Representación esquemática de las principales vías de señalización implicadas en la EMT y de sus interrelaciones (Thiery *et al.*, 2006).

1.3.3. Vía Ras

Esta ruta, altamente conservada, constituye una de las cascadas moleculares más importantes en la regulación de aspectos clave de la funcionalidad celular como la diferenciación, la proliferación y la migración (Avruch, 2007). Su activación transmite señales desde distintos tipos de receptores de membrana hasta activar factores de transcripción nuclear. Una pequeña proteína de unión a guanosintrifosfato (GTP), denominada *ras*, es la molécula que actúa como transductor inicial y común de la señal iniciada tras la activación de los receptores de membrana, comportándose como un interruptor bimodal, con dos conformaciones. La conformación activa produce la activación de la MAP-quinasa-quinasa-quinasa, conocida también como RAF. A su vez, RAF activa, mediante fosforilación, la MAP-quinasa-quinasa o MEK. Finalmente, MEK activa la MAP-quinasa o ERK. Por lo tanto, la estructura básica de MAPK está formada por un módulo de tres quinasas (RAF, MEK y ERK) que se activan de manera secuencial. Mientras que RAF y MEK son de localización citoplásmica, ERK tiene la capacidad de trasladarse al núcleo, y ahí puede fosforilar directamente un gran número de factores de transcripción como c-jun o c-Myc. En los últimos años se ha visto que la desregulación de MAPK está implicada en la carcinogénesis de numerosos tumores humanos. De hecho, una gran cantidad de miembros de la vía fueron identificados inicialmente como protooncogenes. Así, la activación aberrante de la vía MAPK es un hallazgo frecuente en células malignizadas. La vía MAPK puede ser activada a partir de diversas señales extracelulares, como citocinas, factores de crecimiento y otros péptidos a través de su acción sobre receptores de membrana. Entre las diferentes familias de receptores capaces de activar *ras* se encuentran los receptores con actividad tirosin-quinasa (RTK) (Zafon & Obiols, 2009).

1.3.4. Vía del Wnt

Según el modelo molecular más ampliamente aceptado en la actualidad (Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein *et al.*, 2013), la principal ruta de señalización implicada en la carcinogénesis colorrectal, responsable de la transformación del epitelio normal en adenoma, es la vía Wnt. Según dicho modelo, la activación de la vía Wnt β -catenina es una etapa inicial y necesaria para el origen de la práctica totalidad de los tumores de colon. De hecho, diversos estudios indican que alrededor de un 90% de los tumores colorrectales desarrollan mutaciones en alguno de los componentes de la vía Wnt (Giles *et al.*, 2003).

El ligando Wnt es producido en el interior celular y secretado al espacio extracelular donde, de forma autocrina o yuxtacrina, estimula el receptor Frizzled, que inicia la cascada de señalización. En condiciones normales los niveles citoplasmáticos de β -catenina libre son muy bajos, pues esta proteína se encuentra unida a la E-cadherina formando parte de los complejos de unión intercelulares. La poca β -catenina libre es rápidamente unida a ubiquitina por la acción de un complejo ubiquitinizante (formado por las proteínas APC, GSK3-beta y axin) y subsecuentemente degradada por el proteosoma. Cuando el receptor Frizzled es estimulado o cuando acontecen mutaciones en cualquier miembro de este complejo, la β -catenina libre citoplásmica se acumula y se trasloca al núcleo, donde se une a diversos factores transcripcionales (como TCF, LEF o CBP, entre otros) y logra activar los programas genéticos implicados en la proliferación celular, el mantenimiento del fenotipo pluripotente, el incremento de la motilidad celular y de la capacidad metastásica (Argilés *et al.*, 2004).



OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

A la vista del conjunto de intereses que han motivado nuestro estudio y del *statu quo* del conocimiento de la implicación de proteínas *core*-fucosiladas en el proceso de EMT, nos hemos propuesto abordar en el presente Trabajo Fin de Máster los objetivos que a continuación se señalan.

- Estudio de la expresión de marcadores de la EMT en diferentes líneas celulares de CCR.
- Estudio del efecto del silenciamiento del gen *FUT8* en las líneas tumorales de colon SW480 y SW620 sobre la expresión de marcadores proteicos de la EMT.



MATERIAL

Y

MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para llevar a cabo este trabajo, hemos utilizado diferentes líneas celulares de CCR cedidas por el IDIS de la (USC) (HT29, Caco-2, SW480, SW620, HCT116, DLD-1) y por el Grupo de Biomarcadores Biomoleculares (BB1) del Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Universidad de Vigo (COLO-205).

El origen y principales características de estas líneas puede consultarse en la Tabla 1, así como en la Tabla 2 las principales mutaciones que exhiben en ellas los genes con responsabilidad etiológica en procesos de CCR.

Las referidas líneas fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Lonza, España) con 4.5 g/L de glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10% (Life Technologies, USA) y penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma-Aldrich, USA), a 37°C y atmosfera con 5% de CO₂.

Línea Celular	Paciente	Órgano	Morfología	Crecimiento	Enfermedad	Estadio de Dukes
HT29	44 años Mujer	Colon	Epitelial	Adherente	Adenocarcinoma colorrectal	A?
Caco-2	72 años Hombre	Colon	Epitelial	Adherente	Adenocarcinoma colorrectal	B
SW480	50 años Hombre	Colon	Epitelial	Adherente	Adenocarcinoma colorrectal	B
SW620	51 años Hombre	Colon	Epitelial	Adherente	Adenocarcinoma colorrectal	C
DLD-1	Hombre	Colon	Epitelial	Adherente	Adenocarcinoma colorrectal	C
HCT116	48 años Hombre	Colon ascendente	Epitelial	Adherente	Carcinoma colorrectal	D?
COLO-205	70 años Hombre	Colon	Epitelial	Adherente Suspensión	Adenocarcinoma colorrectal	D

Tabla 1. Características principales y procedencia de las líneas celulares utilizadas (Brattain *et al.*, 1983; Moyer & Poste, 1989; Ahmed *et al.*, 2013; www.atcc.org).

Las principales alteraciones genéticas presentes en las líneas celulares de CCR afectan a los genes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, *P53* y *APC* (Tabla 2).

Línea Celular	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>P53</i>	<i>APC</i>
HT29	Wt	p.V600E	p.P449T ^b	wt	p.R273H	p.E853; p.T1556 [§]
Caco-2	Wt	wt	wt	wt	p.E204X	Wt
SW480	p.G12V	wt	wt	wt	p.R273H; p.P309S	Wt
SW620	p.G12V	wt	wt	wt	p.R273H; p.P309S	p.Q1338
DLD-1	p.G13D	wt	p.E545K; p.D549N	wt	p.S241F	Wt
HCT116	p.G13D	wt	p.H1047R	wt	wt	Wt
		wt		wt		Wt
COLO-205	wt	p.V600E	wt	wt	p.Y103_L111>L	p.T1556 [§]

Tabla 2. Estado mutacional de los principales genes involucrados en la carcinogénesis colorrectal en las líneas tumorales utilizadas en este trabajo (Moyer & Poste, 1989; Ahmed *et al.*, 2013; www.atcc.org).

3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRA PROTEICA

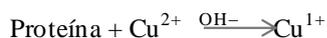
Tras alcanzar confluencias del 70-80%, se procedió a la recogida de las células mantenidas en cultivo y a levantarlas con tripsina (Versana, Lonza, España), para extraer la proteína. Para ello, se comenzó con una serie de lavados de las placas con PBS y separación física de las células mediante un *scraper*, con el objeto de recoger el mayor número posible de ellas. A continuación, las células separadas se recogieron mediante centrifugación (375xg, 5 min, 4°C; centrífuga Beckman GS-15R, USA) y se resuspendieron en 100 µL de RIPA [0.1% SDS (p/v), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.5% DOC (p/v), 1% NP-40 (p/v), 2 mM Na₃VO₄, 4 mM NaF, 1xPIC]. Posteriormente se procedió a la homogeneización de las células mediante sonicación

ligera de 3 min a base de ciclos de 5 s al 15% de potencia, seguidos de 1 min de descanso en baño de hielo. Finalmente, el extracto homogeneizado se centrifugó (10,000xg, 10 min a 4°C; centrífuga Beckman GS-15R, USA), se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su uso.

3.3. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA

La determinación de la concentración proteica de las muestras obtenidas se llevó a cabo por el método del ácido bicinónico (BCA, Sigma-Aldrich, USA). Este método resulta sencillo, rápido, muy sensible y muestra una gran tolerancia a compuestos que interfieren con otros métodos.

El ácido BCA es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con los iones Cu^{2+} en medio alcalino. La formación de este compuesto constituye la base del método de cuantificación proteica consistente en la monitorización del ión cuproso producido por reacción de las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret).



El reactivo se preparó añadiendo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4% p/v) en proporción 1/50 (v/v) al BCA. La mezcla de reacción consistió en 10 μL de muestra proteica, 90 μL de H_2O , 100 μL de SDS al 0.5% (p/v) y 800 μL del reactivo de trabajo. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Paralelamente al análisis de las muestras, se realizó una recta patrón de seroalbúmina (concentración 2-100 μg). Una vez preparados los tubos con la mezcla de reacción, se agitaron e incubaron durante 30 min a 37°C en un baño termostatzado (Selecta, España). Después de la incubación, se dejaron enfriar y se midió su absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Kontron (Uvikon-930, Alemania).

3.4. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para proceder a la separación de las proteínas en base a su masa molecular, se sometieron los extractos proteicos obtenidos a partir de las diferentes líneas celulares a electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para ello, se confeccionaron minigeles (82 mm x 68 mm x 0.75 mm) al 8% de acrilamida total [30% acrilamida/bisacrilamid solution, 37, 5:1 (2,6% c), Bio-Rad, USA], en presencia de agentes aceleradores de la polimerización como el persulfato amónico al 10% (p/v) [Plus One™ Ammonium Persulfate, Amersham, Alemania] y TEMED al 0.05% (v/v) [Plus One™ TEMED, Amersham, Alemania].

Los minigeles se cargaron con 20 µg de proteína total procedente de las diferentes líneas celulares. Como marcadores de masa molecular se utilizó la colección BlueStar PLUS Prot. Marker (Nippon Genetics Europe GmbH, Alemania) y como tampón de electroforesis Tris 25 mM, glicina 0,19 M, SDS al 0.1% (p/v), pH 8.3. La electroforesis se desarrolló en una unidad Mini-Protean Tetra Cell, alimentada mediante una fuente PowerPac™ Basic (ambas de Bio-Rad, USA). El voltaje aplicado fue de 90 V hasta que las proteínas alcanzaron el gel separador, y de 150 V durante el resto del tiempo de desarrollo.

3.5. WESTERN BLOT

Una vez completada la separación mediante electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm de tamaño de poro (HyBond™-P, Amersham, Alemania), previo lavado de los geles con H₂O mQ durante 5 min y, finalmente, con tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% de metanol en H₂O destilada) durante 15 min. Para la activación de la membrana, se utilizó metanol puro durante 20 s y para el equilibrado tampón de transferencia durante 20 min.

La transferencia se realizó a 100 V durante 1 h en un chasis Mini Trans-Blot conectado a una fuente de alimentación PowerPac™ Basic (ambos de Bio-Rad, USA). El proceso se realizó en baño de hielo y con agitación.

Una vez realizada la transferencia se procedió al lavado de la membrana con H₂O mQ para eliminar los restos de tampón. Asimismo, se sometió el gel a una solución de tinción como control del correcto proceso de transferencia. La solución de tinción consistió en azul brillante de Coomassie al 0.1% (p/v) (R-250, Bio-Rad, USA), ácido acético al 9% (v/v) y metanol al 45% (v/v). La solución de desteñido, por su parte, constó de ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v).

3.6. INMUNOBLOT

Una vez realizada la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF, se procedió al revelado de las especies proteicas de interés por *immunoblot*. Para este cometido se empleó un dispositivo en sándwich anticuerpo 1º/2º con los anticuerpos que aparecen en la Tablas 3 (Ac 1^{os}) y Tabla 4 (Ac 2^{os}).

<i>Anticuerpo 1º</i>	<i>Dilución</i>	<i>Descripción</i>	<i>Referencia</i>
FUT8	1/1000	Monoclonal IgG _{2a} Mouse	Proteintech (66118-1-Ig)
Cocktail de detección múltiple (vimentina, β-catenina, α-actina, GADPH)	250x	-----	Abcam (ab157392)
E-cadherina	1/1000	Monoclonal IgG ₁ Mouse	Abcam (ab1416)
N-cadherina	1/500	Monoclonal (3BA) Ig G _{1,k} Mouse	Invitrogen(33-3900)
NCAM	1/750	Monoclonal mouse	Bioscience (BD-556323)
c-kit /CD117	1/200	IgGRabbit	Proteintech (18696-1-AP)

Tabla 3. Listado de anticuerpos 1^{os} utilizados en los *immunoblots* para la detección de las proteínas de interés.

<i>Anticuerpo 2º</i>	<i>Dilución</i>	<i>Descripción</i>	<i>Referencia</i>
FUT8	1/10000	Anti-mouse IgG (HRP)	Abcam (ab97040)
Cocktail de detección múltiple (vimentina, β-catenina, α-actina, GADPH)	2500x	Anti-mouse, Anti-rabbit (HRP)	Abcam (ab157392)
E-cadherina	1/1500	Anti-mouse IgG (HRP)	Abcam (ab97040)
N-cadherina	1/1500	Anti-mouse IgG (HRP)	Abcam (ab97040)
NCAM	1/5000	Anti-ratIgG (HRP)	Abcam (ab97090)
c-kit /CD117	1/1500	Anti-rabbit IgG-(HRP)	Poteintech (SA00001)-2

Tabla 4. Listado de anticuerpos 2^{os} utilizados en los *immunoblots* para la detección de las proteínas de interés.

Después de tres lavados iniciales de la membrana con TTBS [TBS 0.05% (p/v), Tween 20 (Amersham, Alemania)], de 5 min cada uno, se procedió a su bloqueo con TTBS y 5% (v/v) de leche desnatada durante 1 h a 37°C. A continuación, se incubó la membrana toda la noche (aprox. 12-14 h) con el Ac 1º (vimentina, β -catenina: 250x; E-cadherina: 1:1000; FUT8: 1:1000) diluido en el medio de bloqueo a 4°C y en agitación. Posteriormente, tras varios lavados con TTBS de 10 min cada uno, se incubó la membrana con el Ac 2º (vimentina, β -catenina: 2500x; E-cadherina: 1:1500; FUT8: 1:1500), diluido en el medio de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados de 10 min con solución de TTBS.

Para el revelado se incubó la membrana 5-7 min en oscuridad con el reactivo de quimioluminiscencia (Clarity™ Western ECL Substrate), formado por una mezcla de sustrato y de luminol (1:1), y la visualización del inmunomarcaje se llevó a cabo en el dispositivo para quimioluminiscencia ChemiDoc™ XRS + system (ambos de Bio-Rad, USA).

El análisis de los *immunoblots* se llevó a cabo con el programa ImageLab™ Software (Bio-Rad, USA). El primer paso para optimizar el análisis de la imagen fue eliminar el fondo e identificar los carriles de migración y las bandas proteicas. Una vez dado este paso, el programa permitió calcular los valores de masa molecular correspondientes a cada banda proteica emisora de quimioluminiscencia, en función de los valores de las

proteínas patrón utilizadas en la SDS-PAGE. Además, este *software* proporciona la cuantificación de la intensidad de cada banda detectada en unidades arbitrarias, la cual representa una estimación directa y proporcional de sus niveles de expresión celular.

Para la mayoría de las proteínas, los resultados obtenidos proceden de la media de dos experimentos independientes, excepto en aquellos casos en los que, por problemas técnicos o por falta de éxito en la optimización, se imposibilitó su cuantificación.

3.7. BORRADO Y REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE BLOTTING (STRIPPING)

Para el revelado de las proteínas con masa molecular similar se recurrió al *stripping* de la membrana, esto es, a la eliminación (o borrado) del sándwich de detección de una proteína y a la reutilización de la membrana para la de otra especie proteica.

Para este propósito se incubó la membrana con tampón de *stripping* durante 10 min (glicina 1.5% (w/v), SDS 0.1% (w/v), Tween 20 1% (v/v) y H₂O mQ, pH 2.2), repitiendo el proceso nuevamente con tampón fresco. A continuación se realizaron varios lavados de 10 min con PBS seguidos de lavados de 5 min con TTBS. Al finalizar este proceso, se recuperó la membrana lista para bloquear de nuevo y dar comienzo a un nuevo *immunoblot*.

3.8. SILENCIAMIENTO DEL GEN *FUT8* EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER DE COLON SW480 Y SW620.

Con objeto de estudiar el efecto de la pérdida de expresión, y por tanto actividad, de la enzima $\alpha(1,6)$ FT en líneas tumorales de colon, se procedió al silenciamiento de su gen codificante *FUT8* mediante shRNA. Las líneas celulares seleccionadas para este estudio fueron SW480 y SW620, por representar un buen modelo para el estudio de la relevancia de la enzima durante la formación e invasión tumoral, ya que la primera procede de un tumor primario y la segunda de un foco metastásico del mismo individuo.

Un resumen del proceso de silenciamiento puede observarse en la Figura 6. El procedimiento comienza con la introducción, mediante un lentivirus, de un shRNA, esto es, de horquillas pequeñas de RNA de doble cadena constituidas por la hebra sentido (guía) y antisentido (pasajeras) conectadas por unas secuencias no codificantes de intercalación. Una vez introducidas en las células, estas horquillas de shRNA activan una maquinaria celular que los reconoce y los transforma en siRNA (RNA pequeños).

Estos siRNA son reconocidos por el complejo RISC (Complejo inductor del silenciamiento de RNA), que identifica el mRNA homólogo del siRNA, cortándolo en dos mitades que son después degradadas por la maquinaria celular (Rao *et al.*, 2009).

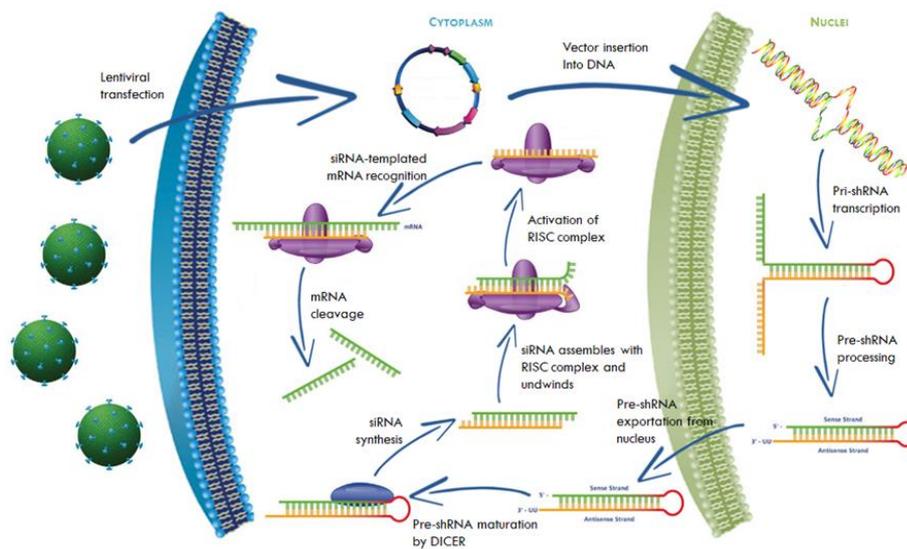


Figura 6. Resumen del mecanismo de interferencia del mRNA mediante shRNA. (Imagen cedida por un colaborador de nuestro grupo de investigación).

El silenciamiento del gen *FUT8* se realizó en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) por la Dra. Muínelo Romay (Grupo de Oncología Médica Traslacional), mediante transfección con shRNA lentivirales (MISSION® shRNA lentiviral transduction particles, pLKO.1-puro-CMV-t GFP, SHCLNV-NM_004480; Sigma, USA), de acuerdo con el protocolo recomendado por la casa comercial. Se utilizaron varios clones de los cuales se seleccionó el NM-004480 / TRCN0000035952 / 10^6 / 0.2 / PLKO.1 (F52), por su eficacia de silenciamiento. Como control negativo del proceso de silenciamiento se utilizó el vector vacío SHC003V (transduction control, MISSION® p LKO.1-puro-CMV-t GFP; Sigma, USA). La selección de la población transfectada se realizó con puromicina 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA).

Una vez completado el silenciamiento, y comprobado mediante TR-q-PCR, se dispuso de las líneas parentales (SW480, SW620), los controles de vector vacío (SW480 NTC y SW620 NTC) y las líneas silenciadas sh*FUT8* (SW480 F52 y SW620 F52).



UNIVERSIDADE
DE VIGO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA

La primera parte del proyecto consistió en la puesta a punto de las condiciones de identificación de las diferentes proteínas de interés. Para cubrir este cometido se realizaron unos experimentos iniciales, en concreto tres, destinados a fijar las concentraciones óptimas de Ac 1º y 2º que permitieran la visualización clara de cada especie a detectar, así como a conocer su peso molecular, con el ánimo de poder llevar a cabo la identificación en paralelo del mayor número de ellas. Este primer conjunto de experimentos permitió llegar a un sistema de detección adecuado para todas las proteínas de interés, tal como se recoge en las Tablas 3 y 4 (apartado 3.6).

4.2. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE CCR

Tras la puesta a punto de las condiciones de identificación se pasó a monitorizar la expresión de las proteínas de interés en extractos celulares de las líneas tumorales seleccionadas. En los apartados siguientes se muestran los resultados de experimentos tipo de detección de cada una de las proteínas analizadas.

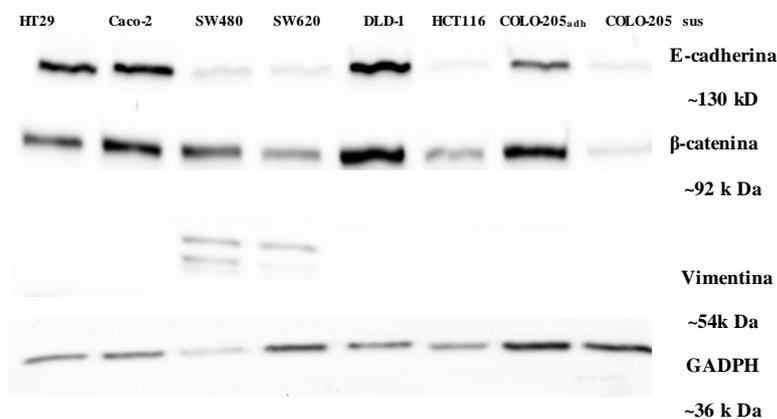


Figura 7. Expresión de E-cadherina, β-catenina y vimentina en diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Caco-2, SW480, SW620, DLD-1, HCT116, COLO-205 adherente y en suspensión). Como control de carga se utilizó la GAPDH.

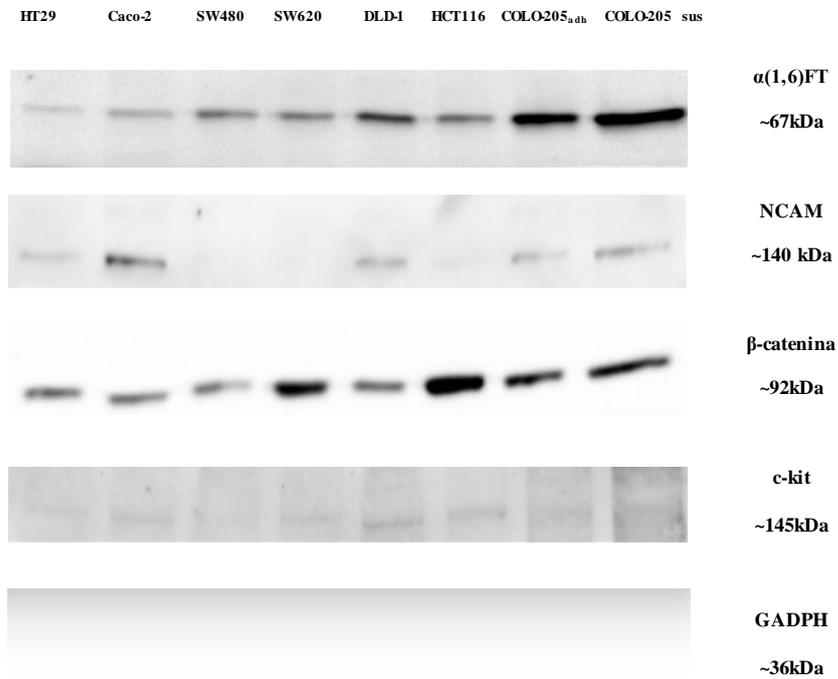


Figura 8. Expresión de $\alpha(1,6)$ FT, NCAM, α -actina y c-kit en diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Caco-2, SW480, SW620, DLD-1, HCT116, COLO-205 adherente y en suspensión). Como control de carga se utilizó la GADPH.

4.2.1. EXPRESIÓN DE E-CADHERINA

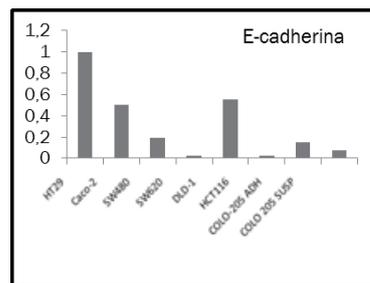


Figura 9. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la E-cadherina con respecto a su control de carga GADPH. Los resultados proceden de la media de dos experimentos independientes.

En la mayoría de los cánceres epiteliales, la pérdida de la proteína E-cadherina en la superficie celular se correlaciona con el aumento del potencial invasivo de las células

tumorales, ya que el debilitamiento de su actividad adhesiva imprime propiedades de EMT a la célula, concretamente un incremento de la movilidad y de la capacidad invasiva de las células (Birchmeier & Behrens, 1994). En este sentido, el papel de la E-cadherina como represor de la metástasis está bien documentado (Cavallaro & Christofori, 2001; Di Croce & Pelicci, 2003) y por ello se le asigna un papel como supresor tumoral. Así, la pérdida de E-cadherina en las células epiteliales lleva aparejada una pérdida del contacto célula-célula y un incremento de la movilidad, mientras que la expresión forzada de esta proteína en líneas tumorales metastásicas es suficiente para cambiar este fenotipo (Cavallaro & Christofori, 2001).

En las líneas celulares estudiadas observamos la mayor expresión de E-cadherina en HT29 y algo inferior en Caco-2, procedentes de un tumor en estadio A y B de Dukes, respectivamente (Figura 9). Por otro lado, entre SW480 y SW620 la mayor expresión aparece en la primera. Ambas líneas proceden de un mismo paciente en estadio B de Dukes (SW480 del tumor primario y SW620 de un foco metastásico de éste), por lo que la mayor presencia de E-cadherina en SW480 está en plena sintonía con su menor capacidad invasiva en comparación con SW620. Lo mismo ocurre entre las dos subpoblaciones de COLO-205 testadas, adherentes y en suspensión; resultando lógicamente la expresión mayor en la que crece adherida a la placa. En el caso de HCT116 la expresión de E-cadherina es prácticamente nula, pudiendo justificar su procedencia de un tumor de estadio D, según algunos estudios (Brattain *et al.*, 1983). Sin embargo, por idéntico motivo la alta expresión de E-cadherina en la línea DLD-1 no encuentra justificación en el estadio metastásico del tumor del que procede (estadio C).

4.2.2. EXPRESIÓN DE N-CADHERINA

La N-cadherina, tiene un papel opuesto al de su compañera E-cadherina. Como hemos comentado en el apartado precedente, la función biológica de la E-cadherina está relacionada con la represión de la invasividad, mientras que, sin embargo, la N-cadherina favorece la invasividad y por ello aumenta el potencial metastásico de las células cancerosas (Tomita *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2004).

Nuestro intento de conocer el patrón de expresión de la N-cadherina en las líneas celulares en estudio no se ha visto coronado por el éxito. Tras los negativos obtenidos con el Ac que se indica en el apartado de Material y Métodos, se probó con otro cedido por el IDIS de la USC (Biolegend, ref.350802), que tampoco permitió la detección de

esta proteína (resultados no mostrados). Además, estos intentos fallidos se han producido también en grupos colaboradores. La limitación de tiempo para completar el presente trabajo nos ha impedido indagar en el origen de estos negativos de expresión y dilucidar si se trata de un resultado correcto o de un falso negativo resultante de la falta de ajuste de alguna variable o condición del ensayo o, acaso, de una deficiencia de afinidad de los dos Ac utilizados.

4.2.3. EXPRESIÓN DE β -CATENINA

Se ha descrito que la hiperproliferación del epitelio intestinal está muy relacionada con la activación aberrante de la cascada de señalización de la β -catenina, la Wnt. Son varios los estudios, asimismo, que argumentan que la β -catenina, en el complejo con TCF, controla la expresión de una serie de genes involucrados en la inhibición de la diferenciación y estimulación de la proliferación celular (Tetsu & McCormick, 1999; van de Wetering *et al.*, 2002). Sin embargo, la vía Wnt no parece que influya tanto en la progresión del tumor cuando hay presencia de mutaciones en *APC*, que son más comunes de la enfermedad esporádica (Ribes *et al.*, 2009), en la que la frecuencia mutacional ronda el 60% y registra una disminución de la degradación de la β -catenina, que desemboca en su traslocación al núcleo (Brabletz *et al.*, 2002). Aunque el 40% de los CCR con MSI (inestabilidad de microsatélites) contienen *APC* no mutado (“wild type”), portan otros defectos en la vía Wnt que causan igualmente estabilización de β -catenina y aumento de su presencia y actividad en el núcleo (Brabletz *et al.*, 2002). A pesar de todo esto, en nuestro estudio observamos que las líneas celulares que portan mutaciones en *APC* (HT29, SW620 y COLO-205) expresan menor cantidad de β -catenina que las no portadoras (Figura 10), lo que sugiere que la presencia de este tipo de mutaciones no parece influenciar en la expresión del complejo E-cadherina/catenina. El diseño experimental de nuestro estudio por *immunoblot* de la expresión de proteínas marcadoras de EMT no nos permite discriminar para el caso de la β -catenina la localización subcelular (nuclear o citosólica vs. membrana) de los niveles detectados, lo cual resulta insoslayable para poder discriminar su función como regulador transcripcional. Así, de detectarse fundamentalmente asociada a la membrana, la β -catenina sería un indicador de fenotipo epitelial (normal), mientras que su aparición en el citosol o núcleo sería indicativo de su actuación como promotora de la EMT.

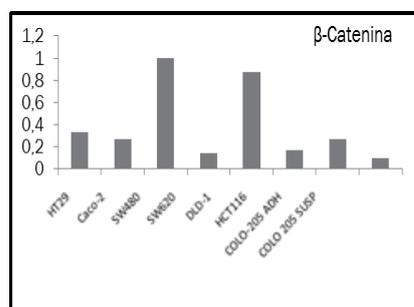


Figura 10. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la β -catenina con respecto a su control de carga GAPDH. Los resultados proceden de la media de dos experimentos independientes.

No obstante esta limitación, los resultados obtenidos del análisis de expresión global de la β -catenina en los extractos celulares de las líneas ensayadas (Figuras 7 y 10) prueban indirectamente su implicación en el proceso EMT mostrando diferencias claras en células tumorales bien en diferente estadio tumoral o con distinto fenotipo maligno (Figura 10). Sin embargo, no observamos que estas diferencias se relacionen con el estadio del que proceden, ya que podemos ver niveles bajos de esta proteína tanto en líneas que proceden de estadio A (HT29) como en líneas que proceden de estadio D (COLO-205, HCT116). Por el contrario, si observamos cierta relación al comparar SW480 y SW620: la primera (procedente de un estadio B y de menor malignidad) presenta unos niveles de β -catenina muy por encima de los de su partenaire SW620 procedente de una metástasis del mismo paciente que el anterior. También es el caso de COLO-205 adherente (mayor expresión) que COLO-205 en suspensión (menor expresión). Pese a estos resultados, hay que ser cautos sobre su auténtica significación, ya que, como se ha indicado, es la expresión nuclear de β -catenina la que está correlacionada positivamente con el proceso EMT.

4.2.4. EXPRESIÓN DE $\alpha(1,6)$ FT

En la Introducción de esta memoria hemos documentado que algunas glicoproteínas relacionadas con el desarrollo y la progresión tumoral (y concretamente con el proceso EMT) muestran alteraciones específicas de su patrón de *core*-fucosilación y que esta fucosilación depende por entero de la actuación singular de una única enzima, la $\alpha(1,6)$ FT (FUT8).

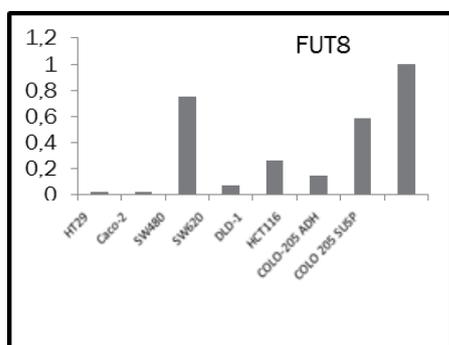


Figura 11. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la $\alpha(1,6)$ FT con respecto a su control de carga GAPDH. Los resultados proceden de la media de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos de nuestros experimentos de detección de esta enzima muestran una expresión prácticamente nula en las líneas HT-29 y Caco-2, ambas derivadas de procesos tumorales en estadios de Dukes iniciales (A y B respectivamente). Sin embargo, esta misma expresión es mayor en SW480 (estadio B) y en COLO-205 (estadio D). Si comparamos la expresión de $\alpha(1,6)$ FT en SW480 y SW620, observamos una mayor expresión en la primera, que procede de un estadio menos invasivo, lo que confirma los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo, en los que se describía mayor actividad de la enzima en tumores que en tejido sano del mismo paciente y una mayor actividad en los estadios iniciales, que se reduce progresivamente en los estadios posteriores (C y D) (Muinelo-Romay *et al.*, 2008).

Por el contrario, comparando las dos subpoblaciones de COLO-205, observamos mayor expresión en la subpoblación de crecimiento en suspensión. En conclusión, no encontramos apariencia de correlación entre la expresión de la enzima $\alpha(1,6)$ FT en las líneas tumorales probadas y su correspondiente estadio de Dukes.

4.2.5. EXPRESIÓN DE VIMENTINA

Muchos estudios han identificado en la vimentina una proteína cuya expresión está muy asociada a los procesos tumorales con características más invasivas (Ngan *et al.*, 2007). Nuestros resultados, sin embargo, muestran expresión de vimentina sólo en las líneas SW480 y SW620, siendo mayor en la primera de ellas, a pesar de proceder de un estadio de Dukes más temprano. Esta aparente contradicción podría encontrar explicación en la hipermetilación del gen de la vimentina, que algunos autores han

observado en los estadios más avanzados del CCR (Shirahata *et al.*, 2009). Otros autores, asimismo, han encontrado metilado el gen de la vimentina en el 53-84% de los carcinomas colorrectales (Itkowizk *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2007a; 2007b), por lo que cabe la posibilidad de que la ausencia de expresión de la vimentina en la mayor parte de las líneas ensayadas por nosotros (Figuras 7 y 12) se deba a la metilación extensiva de la región de control de su gen estructural.

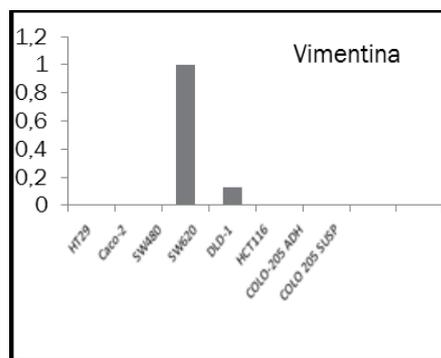


Figura 12. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la vimentina con respecto a su control de carga GAPDH. Los resultados proceden de la media de dos experimentos independientes.

4.2.6. EXPRESIÓN DE α -ACTINA

Como se ha comentado en la sección de Introducción, existen evidencias del aumento de la α -actina durante el proceso de carcinogénesis en diferentes tipos de cánceres, lo que podría estar justificado por la participación de los filamentos de actina en los procesos biológicos de la división celular, las interacciones célula-célula, así como la adhesión y migración celular (Evers *et al.*, 2000). Nuestros resultados muestran unos niveles de α -actina más altos en SW480 y HCT116 (estadio B y D, respectivamente), lo que se correspondería con el aumento de expresión de α -actina durante el proceso de carcinogénesis que acabamos de comentar anteriormente. Asimismo, entre las dos subpoblaciones de COLO-205 también observamos diferencias, siendo la expresión de ésta mayor en la población de fenotipo en suspensión, lo que seguiría apoyando la hipótesis de partida. Sin embargo, los niveles de la misma son más altos en HT29 (estadio A) que en Caco-2 (estadio B) y que en COLO-205 (estadio D). Esto nos lleva a concluir que los resultados mostrados por el conjunto de líneas de colon en el que

hemos testado la expresión de esta proteína no muestran un aumento de la misma en todas las líneas más carcinogénicas ni un patrón de expresión compatible con el estadio de Dukes o el fenotipo tumoral de cada una de ellas, tal como puede apreciarse en las Figuras 8 y 13.

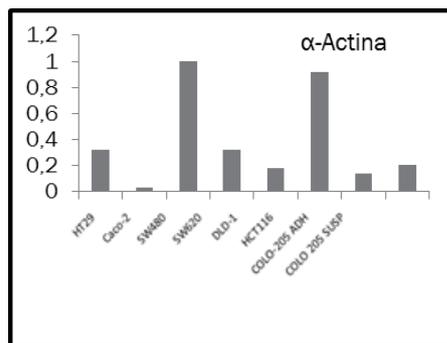


Figura 13. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la α -actina con respecto a su control de carga GAPDH. Los resultados proceden de la media de dos experimentos independientes.

4.2.7. EXPRESIÓN DENCAM

Se ha descrito que la expresión de NCAM aumenta su expresión en los especímenes de tejido tumoral de CCR (Fernández-Briera *et al.*, 2010). En este sentido, nuestro estudio resulta innovador y proporciona una primera aproximación al patrón de expresión de esta proteína en líneas con distinto estatus patológico o con diferencias fenotípicas.

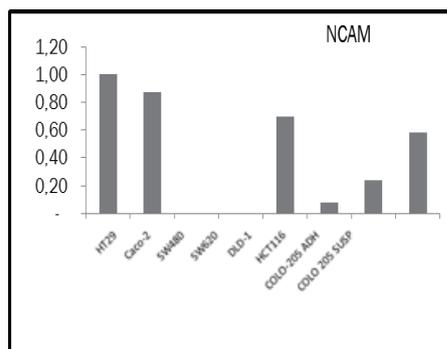


Figura 14. Niveles de expresión (en unidades arbitrarias) de la NCAM con respecto a su control de carga GAPDH. Los resultados obtenidos proceden de un sólo experimento.

Los primeros resultados (Figuras 8 y 14) indican que las líneas SW480 y SW620 se diferencian del resto por no presentar niveles detectables de la NCAM, así como que los niveles de expresión registrados en las restantes (Figura 14) no permiten alcanzar, por el momento, conclusiones sobre la vinculación de esta proteína con el estadio tumoral o potencial maligno de la célula. Resulta chocante, sin embargo, que la línea COLO-205 muestre mayor expresión de NCAM en la estirpe con crecimiento en suspensión que en la adherente, cuando la actividad adhesiva de esta proteína haría sospechar, en principio, una mayor cantidad de anclajes mediados por NCAM en la COLO-205 de fenotipo adherente.

4.2.8. EXPRESIÓN DE C-KIT (CD117)

El papel crítico que la proteína c-kit juega en la proliferación y diferenciación celular en muchos tipos de cánceres (mama, pulmón, próstata) está bien establecido (Tang *et al.*, 2014), mientras que su potencial desempeño en el CCR permanece todavía en controversia. Así, algunos autores han encontrado una correlación entre la expresión de este receptor y el CCR (Bellone *et al.*, 2001), pero otros, por el contrario, no han logrado detectar dicho receptor en la mayoría de las neoplasias examinadas (Sammarco *et al.*, 2004).

En nuestro caso, no se ha conseguido una visualización clara de su expresión en ninguna de las líneas testadas (Figura 8), a la vista de lo cual no podemos establecer si es debido a falta de optimización del proceso o a que realmente no existe expresión de este receptor en el CCR, como se ha postulado en ésta y otras neoplasias (Sammarco *et al.*, 2004).

4.3. CONFIRMACIÓN DEL SILENCIAMIENTO DE *FUT8* EN SW 480 Y SW 620

El gen *FUT8*, que codifica para la enzima $\alpha(1,6)$ FT responsable de la *core*-fucosilación, fue silenciado por tecnología anti-sentido en las líneas SW480 y SW620, tal como se ha descrito en el apartado 3.8 de Materiales y Métodos. Una vez realizado el proceso de silenciamiento, se crecieron (apartado 3.1) las líneas celulares SW480 y SW620 parentales, silenciadas (SW480 F52 y SW620 F52) y controles (transfectadas con un vector vacío; SW480 NTC y SW620 NTC). Con los extractos celulares obtenidos (apartado 3.2) de las diferentes poblaciones de células se procedió a comprobar el

silenciamiento mediante *immunoblot* para la enzima $\alpha(1,6)$ FT (Figura 15). Los resultados obtenidos confirman el éxito del silenciamiento, ya que las células transfectadas con los shRNA anti-sentido específicos de *FUT8* (F52) no muestran expresión de la proteína $\alpha(1,6)$ FT. Este efecto detrimental sobre la expresión de $\alpha(1,6)$ FT no es debido a la transfección en sí, ya que los controles de vector vacío sí muestran expresión de esta proteína.

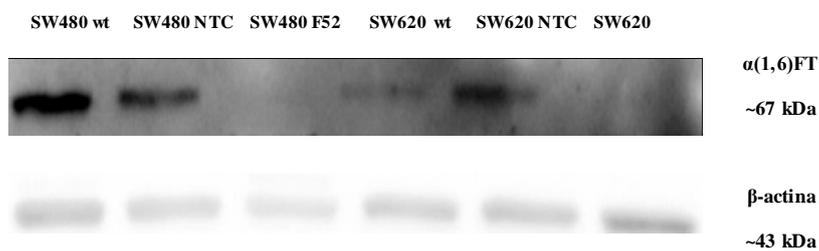


Figura 15. Expresión de la enzima $\alpha(1,6)$ FT en las líneas celulares SW480 y SW620 parentales (silvestres, SW480 wt y SW620 wt) y silenciadas (SW480 F52 y SW620 F52). Como controles del proceso de silenciamiento, parte de las células se transfectaron con un vector de entrega vacío (SW480 NTC y SW620 NTC). Como control de carga para el *immunoblot* se utilizó la β -actina, debido a que en experimentos previos se detectó baja expresión de GADPH en SW480. Se hicieron dos experimentos independientes para comprobar este silenciamiento, y en los dos se comprobó el éxito del mismo.

4.4. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN LAS LÍNEAS SW480 Y SW620 SILENCIADAS EN *FUT8*



Figura 16. Expresión de la E-cadherina, β-catenina, α-actina y vimentina en las líneas celulares SW480 y SW620 (wt, NTC y F52) de cáncer colorrectal. Como control de carga para el *immunoblot* se utilizó la β-actina, debido a que en experimentos previos se detectó baja expresión de GADPH en SW480. Se hicieron dos experimentos independientes para comprobar la expresión, obteniéndose en ambos resultados similares. Sin embargo, algunos problemas técnicos surgidos, unidos a la falta de tiempo, nos han impedido proceder a la cuantificación de los niveles de expresión, por lo que la interpretación y discusión de los resultados se basan en los niveles de expresión aproximados mostrados en la figura.

4.4.1. EXPRESIÓN DE E-CADHERINA EN LAS LÍNEAS SW480 Y SW620 SILENCIADAS EN *FUT8*

La E-cadherina es una molécula de adhesión celular Ca^{2+} dependiente, con un importante papel en la supresión tumoral (Vlemminckx *et al.*, 1991). En el caso de SW480 F52, no se puede observar (Figura 16) una disminución clara de su expresión con respecto a SW480 wt (teniendo en cuenta para ello el nivel de expresión mostrado por el control de transfección, SW480 NTC). Así que, a falta de confirmación en futuros experimentos, la aparente disminución de E-cadherina en la línea silenciada no se puede atribuir al silenciamiento de *FUT8* sino al daño producido por el vector al transfectar la célula. Sin embargo en SW620 ocurre un patrón distinto (Figura 16), la expresión de E-cadherina, como ya comentamos anteriormente, continúa siendo menor que en SW480,

pero en este caso, con la introducción del vector vacío aumenta un poco, y en la silenciada se compensa ese aumento. En cualquier caso es necesario destacar que estos son los primeros experimentos y que, algunos problemas técnicos surgidos, unidos a la falta de tiempo, nos han impedido proceder a la cuantificación de los niveles de expresión, por lo que la interpretación y discusión de los resultados se basan en los niveles de expresión aproximados mostrados en la Figura 16.

4.4.2. EXPRESIÓN DE β -CATENINA EN LAS LÍNEAS SW480 Y SW620 SILENCIADAS EN *FUT8*

Con respecto a la expresión de β -catenina en SW480 F52, observamos un gran aumento comparándolo con su correspondiente parental (SW480 wt) (Figura 16). Además, si relacionamos este resultado con el obtenido para los niveles de E-cadherina en la línea silvestre (Figura 10), podemos establecer que la disminución de la expresión de E-cadherina conlleva el aumento de la expresión de β -catenina, un resultado llamativo que merecerá un estudio posterior confirmatorio y más detallado (diferenciando el nivel de expresión citosólico/nuclear y de membrana de esta proteína). Sin embargo, en la línea SW620 no se aprecian diferencias de expresión de β -catenina entre las células con el gen *FUT8* silenciado y las células inalteradas.

De confirmarse los resultados preliminares que presentamos y certificarse que la disminución de la capacidad celular de *core*-fucosilación cursa con un aumento (al menos en la línea SW480) de la presencia nuclear de la β -catenina, sería un espaldarazo a nuestra hipótesis de partida de que la *core*-fucosilación aumenta la malignidad celular.

4.4.3. EXPRESIÓN DE α -ACTINA EN LÍNEAS SW480 Y SW620 SILENCIADAS EN *FUT8*

Al estudiar la expresión de la α -actina en ambas líneas (Figura 16) no observamos diferencias significativas entre parentales (SW480 wt y SW620 wt), silenciadas (SW480 F52 y SW620 F52), una vez tenido en cuenta el efecto sobre la expresión de esta proteína del proceso de transfección (controles SW480 NTC y SW620 NTC). Así las cosas, debemos establecer que nuestros resultados preliminares apuntan que el silenciamiento de *FUT8* no tiene efecto sobre la expresión de la α -actina.

4.4.4. EXPRESIÓN DE VIMENTINA EN LAS LÍNEAS SW480 y SW620 SILENCIADAS EN *FUT8*

A la vista de los primeros resultados obtenidos, la expresión de vimentina parece aumentar de manera sustancial al silenciar *FUT8* en la línea SW480 (Figura 16). El efecto parece ser específico, puesto que el control de transfección muestra un nivel de expresión inalterado, similar al de la línea parental, por lo que debemos descartar que esta sobreexpresión de vimentina se deba al daño producido en la célula por la mera introducción del vector. Por su parte, los resultados para la línea SW620 apuntan en el sentido de que la inhibición de la expresión de *FUT8* no tiene repercusiones sobre la expresión de la vimentina, ya que si bien la línea silenciada (SW620 F52) muestra un mayor nivel de expresión de esta proteína que la línea parental (SW620 wt), dicho aumento es similar al de la línea control (SW620 NTC), por lo que el efecto sería resultado del daño infligido a la célula por el vector de entrega.

La respuesta obtenida en SW480 F52 es similar a la observada para la β -catenina en la misma línea y si, como parece, la presencia celular de la vimentina también es un indicativo de la incursión de la célula en el proceso de EMT, contaríamos con una evidencia más de que la disminución de la *core*-fucosilación actuaría como un factor favorable a la indiferenciación del epitelio colorrectal y a la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso y, por ello, otorgaría a la célula un mayor potencial metastásico, un mayor poder de invasión. Lo que, por otro lado, en términos funcionales implica que un nivel inalterado de *core*-fucosilación preserva (o puede mejorar) la adhesión celular en líneas tumorales de colon, como han apuntado los resultados obtenidos por otros autores (Osumi *et al.*, 2009). Esta observación aporta una nueva apoyatura a la importancia que puede tener una correcta *core*-fucosilación para la maduración y plena capacidad funcional de muchas glicoproteínas



CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en la sección precedente nos permiten alcanzar tres conclusiones principales:

- ✓ El análisis de los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con el proceso de EMT en las líneas de colon testadas muestra resultados diversos para cada proteína en las diferentes líneas, según sus diferencias en estadio de Dukes, fenotipo patológico y heterogeneidad genética.

- ✓ El silenciamiento mediante shRNA específicos de *FUT8* en las líneas celulares SW480 y SW620 fue un éxito, según se desprende de la comprobación por TR-q-PCR del nivel de mRNA y de proteína por *immunoblot*..

- ✓ El silenciamiento de *FUT8* en SW480 contribuye al aparente aumento de expresión de los marcadores de EMT β -catenina y vimentina. Estos resultados preliminares sugieren la presunta mediación de la *core*-fucosilación en la preservación de la homeostasis celular en CCR, de modo que la depleción funcional de la $\alpha(1,6)FT$ puede favorecer el advenimiento de un fenotipo celular más mesenquimatoso y, así, aumentar la invasividad y potencial maligno de las células tumorales.



BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abad Esteve A, **El Cáncer de Colon y Recto.**(2009) Ed. Marge.
- Agarwal A, Daas K, Lerner, N *et al.*. (2005) **The AKT/I κ B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor- κ B and β -catenin.** Oncogene 24: 1021-1031.
- Ahmed D, EidePW, Eilertsen IA , Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE & Lothe RA. (2013)**Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines.** Oncogenesis 2: 1-8.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P. (2004) **Biología molecular de la célula.** Editorial Omega, 3ª edición.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC) (2009) **AJCC Cancer Staging Manual.** 7th edition. Edited by Edge SB, Byrd DR, Carducci MA. New York
- Argilés G, Dienstmann R, Élez ME & Tabernero J. (2012) Principales alteraciones **genéticas en el cáncer colorrectal.** Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona.
- Avruch J. (2007) **MAP kinase pathways: The first twenty years.** Biochim.Biophys.Acta – Mol. Cell Res. 8: 1150–1160.
- Barker N & Clevers H. **Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer.**(2001) Trends Mol. Med. 7:535-7.
- Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G & Testa JR. (1995) **Molecular alterations of the AKT2oncogene in ovarian and breast carcinomas.** Int. J. Cancer 64: 280-285.
- Bellone G , Carbone A, Sibona N, *et al.* (2001) **Aberrant Activation of c-kit Protects Colon Carcinoma Cells against Apoptosis and Enhances Their Invasive Potential.** Cancer Res. 61: 2200-2206.
- Birchmeier W & Behrens J. (1994) **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions & the prevention of invasiveness.** Biochim. Biophys. Acta 1198: 11-26.
- Boyer B, Valles AM & Edme N. (2000)**Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions.** BiochemPharmacol. 60: 1091-1099.
- Boyle P & Langman JS. (2000) **ABC of Colorectal Cancer, Epidemiology.** Brit. Med. J. 321: 805-808.

Field CodeChanged

- Brabletz T, Jung A & Kirchner T. (2002) **Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer.** Virchows Arch. 441: 1-11.
- Brabletz T., Herrmann K., Jung A., Gerhard Faller, & Thomas Kirchner. (1998) **Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front.** Pathol. Res. Prac. 194: 701-704.
- Brabletz T, Jung ., Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R & Kirchner T. (2001) **Variable b-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.** Medical Sci.98:10356-10361.
- Brattain MG, Marks ME, McCombs J, Finely W & Brattain DE. (1983) **Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour.** Brit. J. Cancer 47:373-381.
- Brognard J, Clark AS, Ni Y & Dennis PA. (2001)**Akt/ prtotein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation.** Cancer Res. 61: 3986-3997.
- Burg MA, Halfter W & Cole GJ. (1995) **Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparin sulphate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule.** J. Neurosci. Res. 41: 49-64.
- Cailleau-Thomas A, Couillin P, Candelier JJ, Balanzino L, Mennesson B, Oriol R & Mollicone R. (2000) **FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis.** Gycobiology 10: 789-802.
- Cavallaro U & Christofori G. (2001) **Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough.** Biochim. Biophys. Acta 1552: 39-45.
- Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. (2001) **N-CAM modulates tumor-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling.** Nat. Cell Biol. 3: 650-657.
- Cavallaro U, Schaffhauser B & Christofori G. (2002) **Cadherins and the tumour progression: is it all a switch?** Cancer Lett. 176:123-128.
- Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK & Testa JR. (1996) **Amplification of AKT2 in human pancreatic cells & inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3636-3641.
- Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtut-man M, Feinstein E, Einart P, Ben -Ze'ev A. (2002) **Nr-CAM is a target gene of the β -catenin/LEF-1 pathway in melanoma & colon cancer & its expression enhances motility & confers tumorigenesis.** Genes Dev. 16: 2058-2072.

Field CodeChanged

Field CodeChanged

Field CodeChanged

Field CodeChanged

- Di Croce L & Pelicci PG. (2003) **Tumour-associated hypermethylation: silencing E-cadherin expression enhances invasion and metastasis.** Eur. J. Cancer 39(4): 413-414.
- DíazRubio E & GarcíaConde J. (2000) **Oncología Clínica Básica.** Ediciones Arán.
- Dijke, P. & Hill, CS. (2004) **New insights into TGF-β-Smad signalling.** Trends BiochemSci. 29:5265–273.
- Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, Ten Klooster JP, Vander Kammen RA, et al. (2000) **Rho family proteins in cell adhesion and cell migration.** Eur. J. Cancer 36: 1269-1274.
- Fagotti, A., Di, R., I, Simoncelli, F., Chaponnier, C, Gabbiani, G., and Pascolini, R., (1998) **Actin isoforms in amphioxus Branchiostomalanceolatum.** Cell and Tissue Research, 292, 173-176.
- Fearon ER & Volgestein B. (1990) **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** Cell. 61(5): 759-767.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C & Maxwell P. (2010) **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008.** Int. J. Cancer: 127, 2893–2917.
- Fernández-Briera A, García-Parcero I, Cuevas E & Gil-Martín E. (2010) **Effect of human colorectal carcinogenesis on the neural cell adhesion molecule expression and polysialylation.** Oncology 788: 196-204 .
- García Gutiérrez A & Pardo Gómez G. (2007) **Cirugía,** Ed. Ciencias Médicas.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. (2003) **Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer.** Biochim. Biophys. Acta. 1653:1-24.
- Goeltz SE, Hession C, Goff D, Griffiths B, Tizard R, Newman B., Chi-Rosso G & Lobb R. (1990) **ELFT: a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand.** Cell 63: 1349-1356.
- Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN & Larue L. (2003) **The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.** Cancer Res. 63: 2172-2178.
- Guarino M. (2007) **Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion.** Int. J. Biochem.Cell Biol. 39: 2153-2160.
- Guirado Blanco O, Solanas García M, Costa Traschel I & EscrichEscriche E. (2002) **El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer.** Rev. Cubana Invest. Biomed. 21: 115-122.

Field CodeChanged

Field CodeChanged

Field CodeChanged

Field CodeChanged

- Hazan RB, Phillips GR, Qiao R F, Norton L. & Aaronson SA. (2000) **Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion & metastasis.** J. Cell Biol. 148, 779-790.
- Hazan RB, Qiao R., Keren R, Badano I & Suyama K. (2004) **Cadherin Switch in tumor progression.** Ann. NY Acad. Sci. 1014: 155-163.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE & Trevor KT. (1997) **Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior.** Am J Pathol 150:483-95.
<http://zl.elsevier.es/es/revista/endocrinologia-nutricion-12/sumario/vol-56-num-04-13007418>
- International Agency for Research on Cancer (2010) Disponible en la dirección: <http://globocan.iarc.fr>.
- Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock M J & Johnson KR. (1996) **Expression of N-cadherina by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion.** J. Cell Biol. 135: 1643-1654.
- Itzkowitz SH, Jandorf L, Brand R, Rabeneck L, Schroy PCIII, Sontag S, Johnson D, Skoletsky J, Durkee K, Markowitz S & Shuber A. (2007) **Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening.** Clin. Gastroenterol. Hepatol. 5: 111-117.
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J & Eriksson JE. (2007) **Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling.** Exp. Cell Res. 313: 2050–2062.
- Kang Y & Massagué J. (2004) **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.** Cell 118:277-9.
- Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP & Lowe JB. (1990) **A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen & the Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase.** Gen. Develop. 4: 1288-1303.
- Larsen RD, Ernst LK, Nair RP & Lowe JB (1990) **Molecular cloning, sequence and expression of a human GDP-L-fucose: β -D-galactoside α 2-l-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6674-6678.
- Li G, Satyamoorthy K & Herlyn M. (2001) **N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells.** Cancer Res. 61: 3819-3825.
- Logan CY & Nusse R. (2004) **The Wnt signaling pathway in development and disease.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20: 781-810.

Field CodeChanged

Field CodeChanged

Field CodeChanged

- Miettinen M & Lasota J. (2005) **Kit (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation.** Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 13: 205-220.
- Miyoshi E, Morikawa K & Nakagawa T. (2008) **Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology.** J. Biochem. 143: 725-729.
- Miyoshi E, Uozumi N, Noda K, Hayashi N, Hori M & Taniguchi N. (1997) **Expression of α 1-6 fucosyltransferase in rat tissues & human cancer cell lines.** Int. J. Cancer 72: 1117-1121.
- Moyer MP & Poste GH. (1989) **Colon Cancer Cells.** New York, Academic Press Inc., 1990 pp. 397-428.
- Muínelo-Romay L, Vázquez- Martín C, Villar-Portela S, Cuevas E, Gil-Martín E & Fernández-Briera A. (2008) **Expression and enzyme activity of α (1,6) fucosyltransferase in human colorectal cancer.** Int. J. Cancer 123: 641-646.
- MuíneloRomay L, Villar-Portela S, Cuevas E., Gil-Martín E, Fernández-Briera A (2011) **α (1,6)fucosyltransferase is an independent prognostic factor disease-free survival in colorectal carcinoma.** Human Patho. 42: 1740-1750.
- Natsuka S, Gersten KM, Zenita K, Kannagi R & Lowe JB. (1994) **Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte α -1.3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant.** J. Biol. Chem. 269: 16789-16794.
- Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i- M, Ikeda J-I, Konishi K, Takemasa I, M Ikeda, Sekimoto M, Matsuura N & Monden M. (2007) **Quantitative evaluation of vimentin expression in tumourstroma of colorectal cancer.** Brit. J. Cancer 96: 986-992.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson R & Wheelock MJ. (1999) **N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression.** J. Cell Biol. 147: 631-644.
- Oriol R, Mollicone R, Cailleau A, Balanzino L & Breton C. (1999) **Divergent evolution of fucosyltransferases genes from vertebrates, and bacteria.** Glycobiology 9: 323-334.
- Osumi D, Takahashi M, Miyoshi E, Yokoe S, Ho Lee S, Noda K, Nakamori S, Gu J, Ikeda Y, Kuroki Y, Sengoku K, Ishikawa M & Taniguchi N. (2009) **Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells.** Cancer Sci. 100: 888-895.
- Rao D, Vorhies JS, Senzer N & Nemunaitis J. (2009) **siRNA vs. shRNA: Similarities and differences.** Adv. Drug Delivery Rev. 61: 746-759.

- Ribes J, Navarro M, Clèries R, Esteban L, Pareja L, Binefa G *et al.*(2009) **Colorectal cancer mortality in Spain: trends & projections for 1985-2019.** Eur. J. Gastroenterol.Hepatol. 21(1): 92-100.
- Rychachou PG, Jackson LN, & Silva SR. (2006) **Targeted molecular therapy of the PI3K pathway therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma.** Ann. Surg. 243: 833-844.
- Sammarco I, Capurso G, Coppola L, Bonifazi AP, Cassetta S, DelleFave G, Carrara A, Battista G, Rossi P & Sette C. (2004) **Expression of the proto-oncogene C-kit in normal and tumor tissue from colorectal catcinoma patients.** Int. J. Colorectal Dis.19:545–53.
- Satelli A & Li S. (2011)**Vimentin as potencial molecular target in cancer therapy.** Cell Mol. Life Sci. 68: 3033-3046.
- Schramm HM. (2014) **Should EMT of Cancer Cells be understood as Epithelial-Myeloid Transition?** J. Cancer 5: 125-132.
- Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y & Kenji Hibi. (2009) **Vimentin Methylation as a Marker for Advanced Colorectal Carcinoma.** Anticancer Res .29: 279-282.
- Stubbs HJ, Lih JJ, Gustafson TL & Rice KG. (1996) **Influence of core fucosylation on the flexibility of a biantennary N-linked oligosaccharide.** Biochemistry 35: 937-947.
- Taberbero Caturla J. (2007) **Cáncer Colorrectal.** Arán ediciones.
- Tang YL, Fan Y, Jiang J, Kai-de Li, Zheng M , Chen W., Ma X., Geng N, Chen Q & Liang X. (2014) **C-kit induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to salivary adenoid cystic cancer progression.** Oncotarget 5: 1491-1501.
- Tetsu O & McCormick F. (1999)**Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** Nature 398: 422-426.
- Thiery JP & Sleeman JP. (2006) **Complex networks orchestrate ephitelial-mesenchymal transitions.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 131-142.
- Thiery JP. (2002) **Epihtelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** Nat. Rev. Cancer 2: 442-454.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Tran NL, Nagle RB, Crees AE & Heimark RL.(1999) **N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines.** An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with stromal cells. Am. J. Pathol. 155; 787-798.
- Van de Wetering M, Sancho E. Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K., Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP *et al.*(2002) **The beta-catenin/TCF-4**

Field CodeChanged

- complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.** Cell 111, 241-250.
- Vlemminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, Van Roy F. (1991) **Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.** Cell 66: 107-119.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Díaz LA & Kinzler KW. (2013) **Cancer genome landscapes.** Science 339: 1546-1558.
 - Wakefield LM & Roberts AB. (2002) **TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis .** Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 22-29.
 - Walsh FS & Doherty P. (1997) **Neural cell adhesion molecules of immunoglobulin super family: role in axon growth & guidance.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol; 13:425-456.
 - Wang Y, Shao ., Shi S, Harris RJ, Spellman MW, Stanley P & Haltiwanger S. (2001) **Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose: molecular cloning and expression of a novel GSP-fucose: protein O-fucosyltransferase.** J. Biol. Chem. 276: 40338-40345.
 - Weston BW, Nair RP, Larsen RD & Lowe JB. (1992a) **Isolation of a novel human α (1,3) fucosyltransferase gene family.** J. Biol. Chem. 267: 4152-4160.
 - Weston BW, Smith PL, Kelly RJ & Lowe JB. (1992b) **Molecular cloning of a fourth member of a human α (1,3)fucosyltransferase gene family.** J. Biol. Chem. 267: 24575-24584.
 - www.aecc.es
 - www.atcc.org/~media/PDFs/CultureGuides/Cell Lines by Gene Mutation.ash
 - Yao X, Chaponier C, Gabbiani G & Forte JG. (1995) **Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells.** Mol. Biol. Cell, 6: 541-557.
 - Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma x, Jiang c, Coppola D, Nicosia SV & Cheng JQ. (2000) Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. Oncogene 19: 2324-2330.
 - Zafon C & Obiols G, (2009) **Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica.** Servicio de Endocrinología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España. 56: 4.
 - Zou H, Harrington J, Rego RL & Ahlquist DA. (2007b) **A novel method to capture methylated human DNA from stool. Implications for colorectal cancer screening.** Clin Chem 53: 1646-1651.

Field Code Changed

- Zou H, Harrington JJ, Shire AM, Rego RL, Wang L, Campbell ME, Oberg AL & Ahlquist DA. (2007a) **High methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2685-2696.

7. ABREVIATURAS

APC: poliposis adenomatosa de colon

BCA: ácido bicínconíco

CCC: complejo citoplasmático de adhesión celular

CCR: cáncer colorrectal

CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

COX2: ciclooxigenasa 2

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EMT: transición epitelio-mesénquima

FBS: suero bovino fetal

FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

FUT: fucosiltransferasa

FUT8: gen de la $\alpha(1,6)$ fucosiltransferasa

GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GDP: guanosina 5' difosfato

IDIS: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

IUBMB: International Union of Biochemistry & Molecular Biology

MSI: inestabilidad de microsatélites

NCAM: molécula de adhesión neural

PBS: tampón salino de fosfato

POFUT1: O-fucosiltransferasa de proteínas 1

POFUT2: O-fucosiltransferasa de proteínas 2

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RISC: complejo inductor del silenciamiento de RNA

RNA sh: horquillas de RNA

RNA si: RNA pequeños

RNAm: RNA mensajero

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

TBS: tampón Tris salino

TCF: factor de célula T

TEMED: N'N'N'N''-tetrametiletilendiamina

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante β 1

TBS: tampón Tris salino con Tween